

CHRISTOF SUND

Der Einfluß der Palmitinsäure
und einiger ungesättigter Fettsäuren
auf die Cholesterinsynthese
in vitro

MÜNCHEN 1960

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Der Einfluss der Palmitinsäure und einiger ungesättigter
Fettsäuren auf die Cholesterinsynthese in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

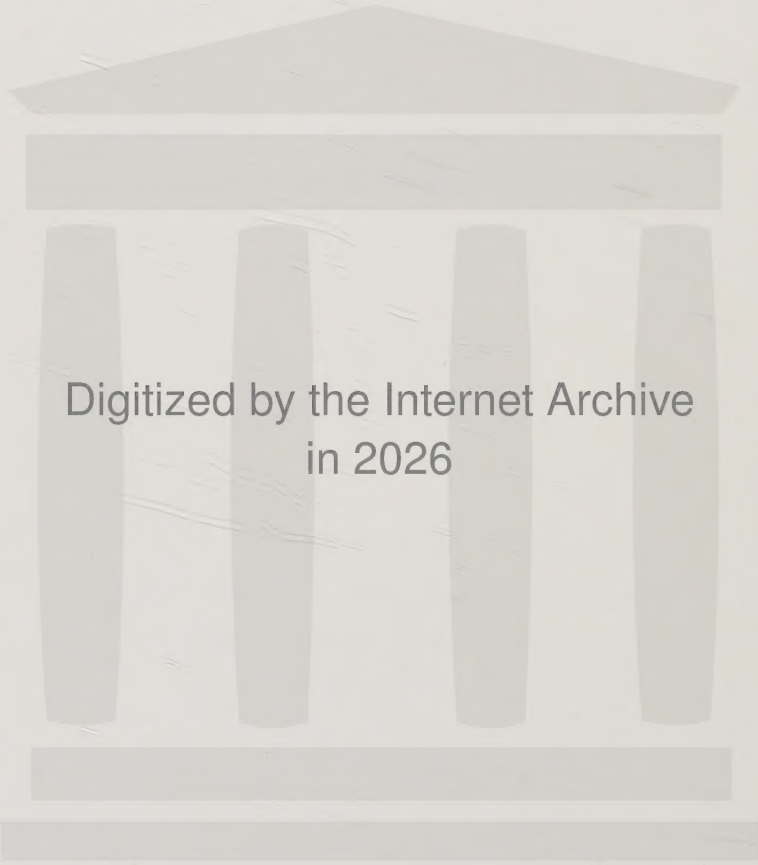
vorgelegt von

C H R I S T O F S U N D

aus

München

1960



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555220_0043

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: *Prof. Dr. Walter Seitz*

Mitberichterstatter:

Dekan: *Prof. Dr. Dr. Hermann Eyer*

Tag der mündlichen Prüfung: *25.10.1960*



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I.	Allgemeines	
	A) Die Synthese des Cholesterins	1
	B) Die Bedeutung des Cholesterins	4
	C) Problemstellung	7
II.	Technik	
	A) Die in-vitro Versuche	
	1. Bereitung des Homogenates	12
	2. Inkubation	13
	3. Bestimmung des neugebildeten Cholesterins	15
	4. Messung der Aktivität	15
	5. Bestimmung des ATP-Gehaltes	16
	6. Cholesterinbestimmung nach 20, 40, 80 und 180 min.	16
	B) Fütterungsversuche	
	1. Darstellung des Enzymsystems	17
	2. Serumcholesterinbestimmung	17
	C) Verwendete Reagentien	18
III.	Ergebnisse	
	A) Die in-vitro Versuche	23
	B) Die Fütterungsversuche	32
IV.	Diskussion	34
V.	Zusammenfassung	40
VI.	Literaturverzeichnis	43

Abb. 1	Der Aufbau des Cholesterins aus dem Squalen	8
Abb. 2	Die Bildung der Mevalonsäure aus Acetat	9
Abb. 3	Die Bildung des Squalens aus der Mevalonsäure	10
Abb. 4	Kurven zu Tabelle 1	25
Abb. 5	Kurven zu Tabelle 2	27
Abb. 6	Kurven zu Tabelle 3	30
Abb. 7	ATP-Gehalt mit Zusatz von Palmitinsäure	31
Abb. 8	ATP-Gehalt mit Zusatz von Arachidonsäure	31
Abb. 9	Kurven zu Tabelle 5 und 6	

Tab. 1	Ergebnisse der Konzentrationsreihen	23
Tab. 2	Die Zeitkurven	26
Tab. 3	Veränderung des ATP-Gehaltes nach 20, 40, 80 und 180 min.	28
Tab. 4	Durchschnittlicher Sup-Wert	32
Tab. 5	Die Ergebnisse der Fütterungsversuche	33
Tab. 6	Serumcholesterin	33

I. A L L G E M E I N E S

A. Die Synthese des Cholesterins

1) Vom Squalen zum Cholesterin

Bereits im 18. Jahrhundert konnte KONRADI aus Gallensteinen, in denen Cholesterin gehäuft vorkommt, das Cholesterin isolieren und seine chemische Struktur aufklären (1). Der Entstehungsmechanismus war jedoch im einzelnen bis zum Beginn dieses Jahrhunderts unbekannt. Erst als RUZIKA (2) die Zugehörigkeit des Cholesterins zu einer grossen Klasse von Naturstoffen nachwies, die sich formal in Isopreneinheiten ($\text{CH}_2 = \overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}} - \text{CH} = \text{CH}_2$) zerlegen lassen, war der erste Schritt zur Aufklärung getan. 1937 stellten SONDERHOFF und THOMAS (3) an Hand von Acetat, das an der Methylgruppe mit Deuterium markiert worden war, fest, dass die Essigsäure ($\text{CH}_3 - \text{COOH}$) beim Aufbau des Cholesterinmoleküls Verwendung finden muss. (Damals vermutete man noch, dass die Essigsäure als einziger Grundstein anzusehen sei; später fand man jedoch auch noch einen anderen. s.u.). 1926 wurde dann die Struktur des Squalens, das bereits 1916 von TSUIJMOTO (5) aus Haifischleber isoliert worden war, durch HEILBRON, KAMM und OWENS (3) aufgeklärt. Die Autoren wiesen damals bereits auf die grosse chemische Ähnlichkeit des Squalens mit der Struktur der Steroiden hin. Der endgültige Beweis, dass Squalen wirklich ein Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese ist, erfolgte jedoch erst 1953, als es LANGDON und BLOCH

(5,6,7) gelang, mit Hilfe der Isotopentechnik den Weg der Biosynthese zu verfolgen. Sie verfütterten am C-Atom markiertes Acetat ($\text{CH}_3\text{—C}^{14}\text{OOH}$), isolierten markiertes Squalen, verfütterten dieses wiederum und konnten schließlich radioaktiv-markiertes Cholesterin erhalten.

Zur gleichen Zeit vermutete RUZIKA, dass der Ringschluss des Squalens zum Cholesterin über das Lanosterin, dessen Struktur er selbst endgültig geklärt hatte, erfolgen müsse, denn nur dieses besitze noch ebensoviele C-Atome wie das Squalen, während das Cholesterin bereits durch Decarboxylierung 3 C-Atome verloren hat (8, 9) (s.Abb.1). Damit lag als erstes der 2. Teil der Cholesterinsynthese offen, es fehlte jedoch noch der gesamte Weg von den Grundbausteinen bis zu dem doch schon sehr komplex gebauten Squalenmolekül! (3,10,11,12).

2) Von der Essigsäure zur Mevalonsäure

Wie so häufig, wurden auch hier mehrere Zwischenprodukte annähernd gleichzeitig entdeckt, ohne zunächst ihre Zusammengehörigkeit zu erkennen! So war die erste wichtige Voraussetzung die Ermittlung des "Co-Encym-A", die zweite die Identifizierung der sogenannten "aktivierten Essigsäure" und die dritte die Auffindung der Mevalonsäure.

Die aktivierte Essigsäure als der Thioester aus Co-A und Essigsäure ermöglicht den ersten Schritt im langen Aufbauweg, nämlich die Kondensation zweier Molekeln Acetyl-Co-A.

(Dieses wurde beim Studium der Fettsynthese gefunden).(13)
Es entsteht die Beta-hydroxy-beta-methyl-glutarsäure (HMG-säure), die sich plötzlich als sehr wichtige Zwischenstufe erwies (14), denn hier besteht einmal die Möglichkeit Ketokörper (über die Acetessigsäure: Diabetes) zu bilden, zum anderen ist sie selbst Abbauprodukt der Aminosäure "Leucin", die also über diese Zwischenstufe ebenfalls für den Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielen kann.

Gleichzeitig wurde bei anderen Untersuchungen von FOLKERS die sogenannte Mevalonsäure entdeckt, die wegen ihrer grossen Ähnlichkeit mit der HMG-säure als Zwischenprodukt der Cholesterinsynthese angesehen wurde, eine Vermutung, die sich durch zahlreiche Versuche bestätigt fand (3). (s.Abb. 2)

3) Von der Mevalonsäure zum Squalen

Der nächste Schritt, die Bildung des Squalens aus der Mevalonsäure sei hier nur in groben Zügen geschildert, im übrigen jedoch auf die Abbildung 3) verwiesen. Mit der Mevalonsäure war der Grundstein für jenes aktive Isopren gefunden worden, das nach der Forderung von RUZIKA den Baustein des Cholesterins und zahlreicher anderer Verbindungen bilden sollte, (so z.B. die Steroide, Carotinoide, die pflanzlichen Terpene u.a.)(15).

Bei der nun folgenden doppelten Phosphorylierung entstehen energiereiche Phosphate, zu deren Bildung ATP in besonderem Masse gebraucht wird. Gleichzeitig entsteht hierdurch ein einfacher Stoffwechsel-Regulationsmechanismus, da eine Neu-

synthese auch vom Verbrauch der gebildeten Pyrophosphate abhängig ist. Es entsteht aus der Mevalonsäure die 5-Phosphomevalonsäure, die 5-Pyrophosphomevalonsäure und schliesslich durch Verlust einer Carboxylgruppe das Isopentenylpyrophosphat, das lang gesuchte "aktive Isopren". Auch dieser Schritt benötigt ATP, der genaue Mechanismus ist allerdings noch unbekannt (3).

Bevor nun eine Polymerisation dieses aktiven Isoprens erfolgen kann, wird es mit Hilfe einer Isomerase einer Isomerisierung zum Dimethylallylpyrophosphat unterzogen. Durch anschliessende Kondensation je eines Moleküls Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat "Kopf-zu-Schwanz" entsteht das Geranylpyrophosphat und durch eine erneute Kondensation mit einem Molekül Isopentenylpyrophosphat "Kopf-zu-Schwanz" das Farnesylpyrophosphat. 2 Moleküle Farnesylpyrophosphat endlich vereinigen sich "Schwanz-zu-Schwanz" mit Hilfe des TPNH zum Squalen (3).

B. Die Bedeutung des Cholesterins

Das Cholesterin und sein Stoffwechsel spielen heute in der Forschung eine grosse Rolle, einmal, weil, wie wir oben gesehen haben, die genaue Erforschung der Struktur und des Entstehungsmechanismus gleichzeitig den Zugangsweg zu einer grossen Anzahl anderer Verbindungen schuf; zweitens aber, weil vorallem in der Klinik pathologische Veränderungen, besonders Erhöhungen des Serumcholesterinspiegels als Ursache oder Mitursache einiger wichtiger Erkrankungen angesehen wer-

den. (Teils als abnorme Ablagerung, wie bei der Arteriosklerose, teils bei anderen Stoffwechselerkrankungen, z.B. beim Diabetes mellitus, teils als eigene Stoffwechselstörung: Morbus Hand-Schüler-Christian (16,17,18)). Seit langem wird versucht, solche Serumcholesterinerhöhungen durch bestimmte Massnahmen zu vermeiden oder eingetretene Erhöhungen wieder rückgängig zu machen. So wurden zahlreiche Substanzen erprobt, jedoch meist mit nur geringem oder nicht anhaltendem Erfolg. Dann wurde eine Zeitlang das Hauptgewicht auf eine diätetische Behandlung gelegt: einmal vollständig cholesterinfreie Nahrung, zum anderen frei von gesättigten oder einfach ungesättigten Fettsäuren. Man hatte nämlich bei klinischen Untersuchungen zweierlei gefunden: eine Erhöhung des Serumcholesterinspiegels, wie man ihn bei der Arteriosklerose häufig findet, geht meistens einher mit einer deutlichen Verminderung der ungesättigten (Polyen-)Säuren mit einer gleichzeitigen starken Vermehrung der Neutralfette, also mit einer Verschiebung des Gleichgewichtes zu Gunsten der letzteren. Aus früheren Untersuchungen wusste man bereits, dass die Polyensäuren auf den Lipidhaushalt einen senkenden Einfluss auszuüben vermögen (19). Darauf beruhten die Diäten, die wenigstens die im Übermass vorhandenen gesättigten Fettsäuren zu vermeiden suchten. Die Erfolge waren, was die Senkung des Serumpiegels anbetraf, mässig.

Dann hatte man gefunden, dass die pflanzlichen Sterine (Phytosterine, wie z.B. das Sitosterin) einen deutlich senkenden Einfluss hatten und sich diese Wirkung so erklärt, dass die Phytosterine nicht resorbiert werden können und die Sen-

kung des Serum-cholesterins auf einer vermehrten Ausscheidung oder einer verminderten Resorption beruhte (SCHÖNHEIMER, PETERSON). Es sollten sich Mischkristalle ausbilden. HENNING konnte jedoch auf Grund von Bilanzversuchen zeigen, dass die Hemmung nicht physikalischer, sondern spezifisch-chemischer Natur sein müsse (20).

Bei der Bewertung all dieser Versuche muss noch dazu beachtet werden, dass der menschliche Organismus durchaus in der Lage ist bei kalorienmässig normaler Ernährung alles verbrauchte Cholesterin nachzubilden, vor allem in der Leber, aber auch sonst in fast allen Organen. (Die Halbwertszeit des Serumcholesterins beim Menschen beträgt etwa acht bis zehn Tage).(16)

Diese Faktoren werden nun von einigen Autoren bereits wieder abgelehnt. Die Lipide seien als eine funktionelle Einheit zu betrachten, bei der die Bestimmung von Einzel-Fraktionen mit zu grossen Fehlern behaftet sei, um genaues aussagen zu können. Andere haben auch mit gesättigten Fettsäuren cholesterinsenkende Erfolge erzielt. (Allerdings bei sehr hohen Gaben, mit strengster Vermeidung einer Überschreitung der Kalorienmenge).(21)

So ist also bei den Untersuchungen des Cholesterinstoffwechsels auf klinischer Seite alles im Fluss.

C. Problemstellung

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es nun, unter Laborbedingungen nachzuweisen, in wie weit bestimmte Fettsäuren, gesättigte und ungesättigte, im Stande sind, die Cholesterinsynthesefähigkeit der Leber herabzusetzen und in wie weit sich hierbei Unterschiede zwischen den einzelnen Fettsäuren feststellen lassen.

Zu diesem Zwecke wurden aus Taubenlebern gewonnene Fermentsysteme verwandt, die nach den Angaben von BUCHER u.a. (22,23) im Stande sind, Cholesterin zu synthetisieren. Um das neugebildete Cholesterin von dem bereits in der Leber vorhandenen unterscheiden zu können, wurde radioaktiv markiertes Na-Acetat als Ausgangssubstanz herangezogen ($\text{CH}_3\text{C}^{14}\text{OONa}$). Bei einer Isolierung des gesamten Cholesterins konnte dann das neugebildete Cholesterin von dem bereits vorhandenen durch Messung der spezifischen Aktivität mit einem Geiger-Müller-Zählrohr abgetrennt und quantitativ gemessen werden.

Abbildung 1): Der Aufbau des Cholesterins aus dem Squalen

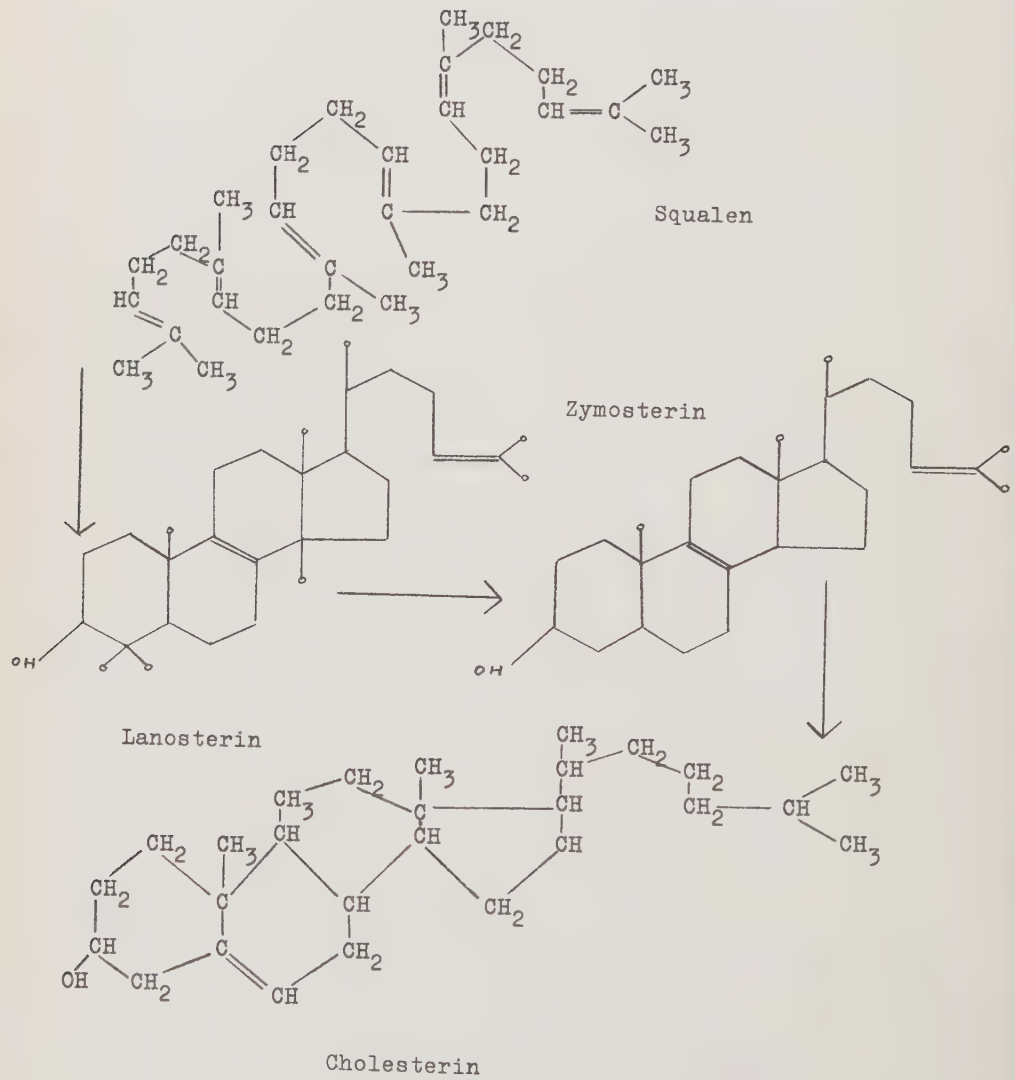


Abbildung 2): Die Bildung der Mevalonsäure aus Acetat

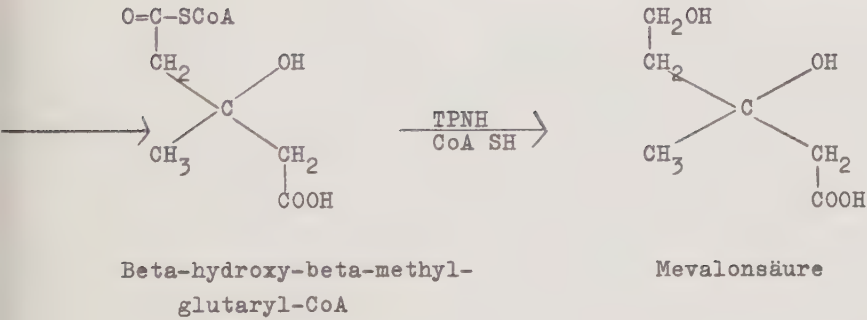
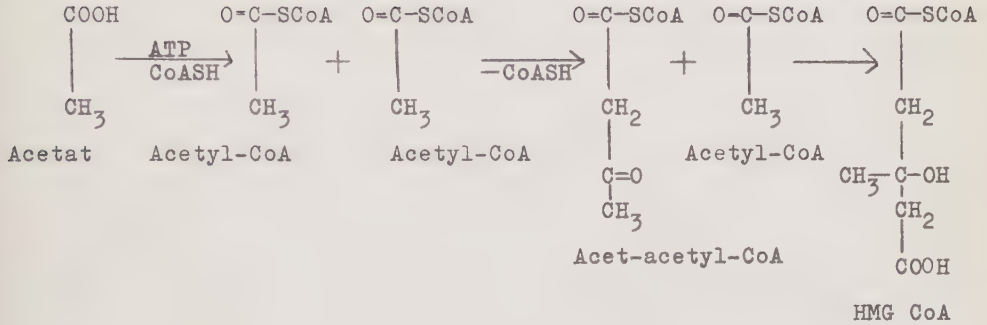


Abbildung 3): Die Bildung des Squalens aus der Mevalonsäure

Abkürzungen: Mev.: Mevalonsäure, Isp-PP: Isopentenyl-pyrophosphat
 Dmal-PP: Dimethylallylpyrophosphat
 Kopf ist die CH₂-tragende Gruppe,
 Schwanz das Pyrophosphat

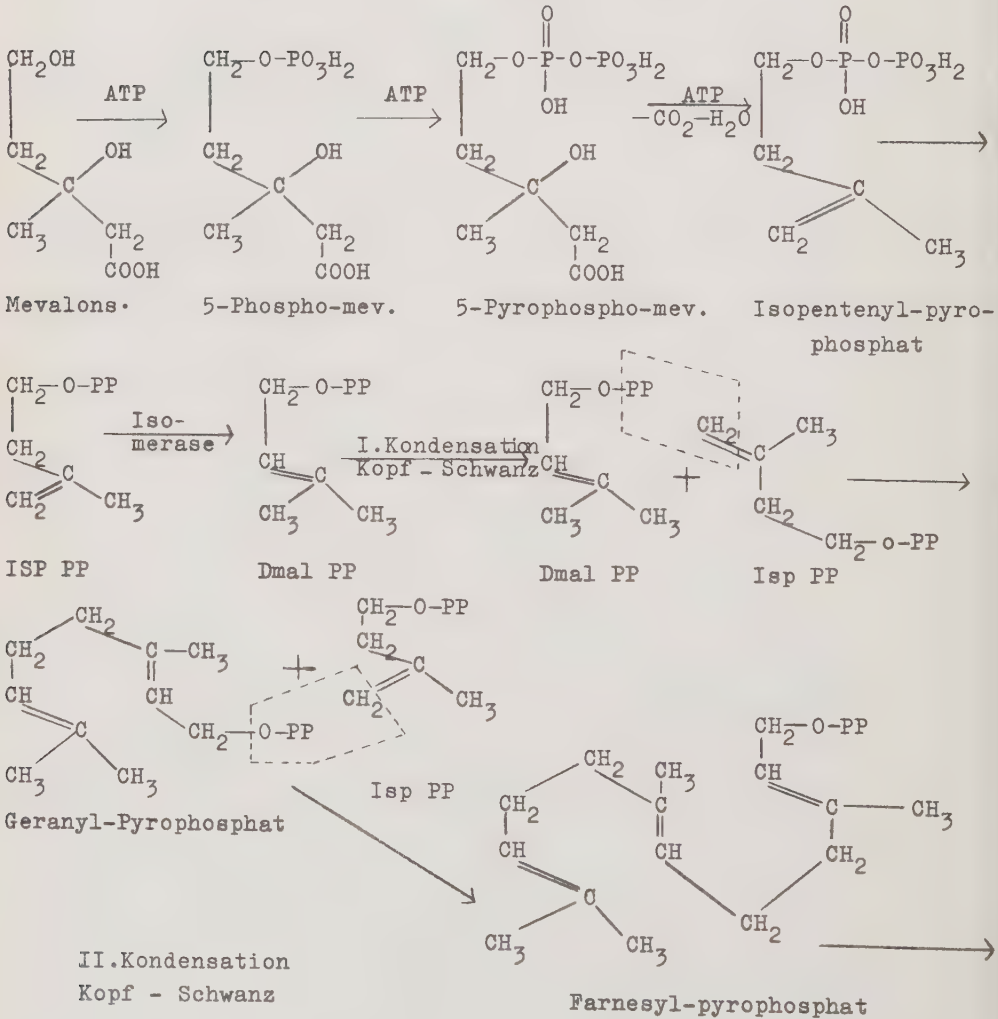
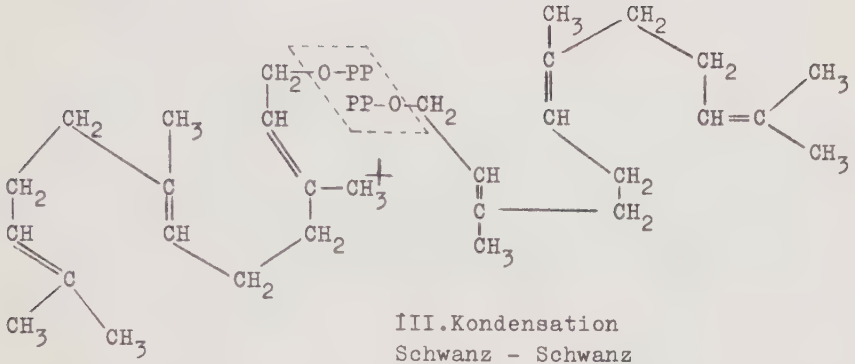
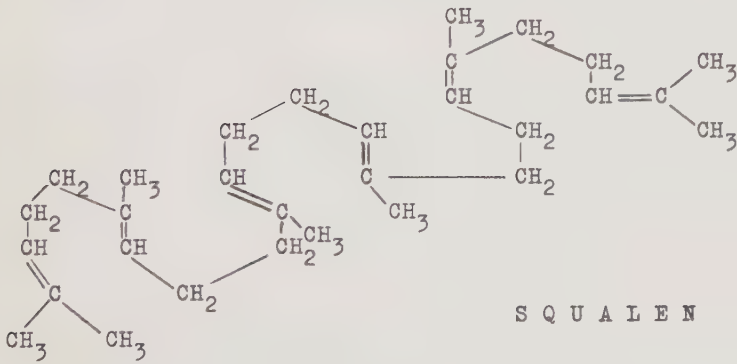


Abbildung 3)



Farnesyl-pyrophosphat

Farnesylpyrophosphat



II. T E C H N I K

Die Grundlage unserer Versuche waren Präparationsangaben, die BRADY und GURIN ursprünglich zur Neubildung von Fettsäuren angegeben hatten (18). Wir verwendeten im Gegensatz zu ihnen Tauben, da bereits früher festgestellt worden war, dass diese Tiere erfolgversprechender sind als Ratten.

Wir unternahmen im einzelnen folgende Versuche (22 - 29):

In vitro-Versuche:

Konzentrationsreihen der untersuchten Fettsäuren.

Bestimmung des ATP-Gehaltes bei verschiedenen Inkubationszeiten.

Bestimmung der Cholesterinentstehung.

Fütterungsversuche:

Darstellung des Enzymsystems aus der Leber der gefütterten Tiere und Bestimmung der Cholesterinsynthesefähigkeit.

Bestimmung des Serumcholesterins dieser Tiere.

A. Die in vitro-Versuche.

1) Die Bereitung des Homogenates

Wir verwendeten 6 - 9 Monate alte Tauben, die längere Zeit vorher ausschliesslich mit Weizenkörnern ernährt worden waren. Es muss besonders darauf geachtet werden, keine Hungertauben zu erhalten, da Hunger bekanntlich die Cholesterinsynthese stark herabsetzt. Nach Dekapitation mittels Scherenschlag werden die Lebern sofort entnommen und in Eiswasser gelegt, anschliessend von Bindegewebe und Fett grob gereinigt, mit Filterpapier getrocknet und gewogen. Bereits makroskopisch erkrankte Lebern, wie bei Ikterus, Tumoren oder starken Verwachsungen mit der Um-

gebung wurden ausgeschieden. Wir verarbeiteten die Lebern von je 4 Tauben zu einem Versuchsansatz, um bereits hier eine individuelle Schwankungsbreite, die relativ gross sein kann, so weit wie möglich auszuschalten. Nach grober Zerkleinerung werden sie im Verhältnis 1 : 1,5 mit Puffer versetzt und in einem "Potter Elvehjem Homogenisator" homogenisiert (Zusammensetzung des Puffers: 0,085 m K_2HPO_4 , 0,009 m KH_2PO_4 , 0,07~~m~~ $KHCO_3$ zu gleichen Teilen; pH 7,4) (26).

Dieses so erhaltene Homogenat wird nun bei 2000 U/min 45 min zentrifugiert und der erhaltene Überstand erneut mit dem gleichen Puffer verdünnt, und zwar sowat, dass jetzt 4 ml Homogenat einer Ausgangsmenge von 3 g Leber entsprechen. Man zentrifugiert dann nochmals bei 25000 U/min 1 1/4 Std., der Überstand (supernatand fluid = Sup) wird abgossen. Er enthält nun alle zur Cholesterinsynthese wichtigen, löslichen Fermentsysteme. (Es ist darauf zu achten, dass alle Manipulationen bei annähernd 0 Grad vorgenommen werden, da das Fermentsystem sehr wärmeempfindlich ist)(23,26).

2) Die Inkubation

Die Ansätze werden anschliessend in dem von WARBURG beschriebenen Inkubator bei 38° und unter ständigem Schütteln inkubiert (3 Std). Den Ansätzen war vorher Magnesiumchlorid und Natriumcitrat in einer optimalen Konzentration zugesetzt worden, ausserdem aktives C^{14} -Acetat und je nachdem die zu testende Substanz. Genaue Zusammensetzung des Inkubationsgemisches: (22,26)

0,1 ml MgCl_2 = 0,008 m

0,1 ml Natriumcitrat = 0,01 m

0,4 ml $1\text{-C}^{14}\text{-Acetat}$ = 0,008 m

2,3 ml supernatand fluid

Testsubstanz

und Wasser oder Puffer, bis in allen Versuchen eine Gesamtmenge von 3,0 ml erreicht ist.

Da die meist geringen Mengen Fettsäuren nicht mehr eingewogen werden konnten, wurde ein entsprechender Teil einer alkoholischen Lösung einpipettiert und der Alkohol anschliessend auf dem Wasserbad abgedampft (Alkohol zerstört bekanntlich viele Fermente). Bei den Versuchen mit CO_2 -Begasung wurden die Warburgkölbchen 10 min lang mit Sauerstoff-freier Kohlensäure durchspült und dann die Gefässe zur Erhaltung des Milieus geschlossen. die anderen Versuche liefen mit freiem Zutritt der umgebenden Luft.

Nach Beendigung der dreistündigen Inkubation wird der Inhalt eines Warburgkölbchens mit 7 ml aqua bidest in ein Rundkölbchen von 50 ml Volumen übergespült und zusammen mit 5 ml 30% alkoholischer KOH und 25 mg Palmitinsäure als Trägersubstanz unter ständigem Rückfluss verseift - 4 Stunden lang. Nach dem Abkühlen wird die Lösung zusammen mit etwa 20 ml Petroläther in einen Scheidetrichter gefüllt und durch Zusatz von 18 % HCl bis zum Umschlag des Indikators (Bromcresylgrün - Methylorange) leicht angesäuert. Hierauf werden die gebildeten Fettsäuren und das Cholesterin durch 4-maliges Ausschütteln mit Petroläther (30° - 50°) extrahiert und über einem Wasserbad langsam eingedampft. Der Rückstand wird in einem 10 ml Kölbchen mit Petroläther bis zur Marke aufgefüllt

und 4 ml für die folgende Cholesterinbestimmung entnommen.
(Die restlichen 6 ml dienen zur Bestimmung der Fettsäuren, s.
v.BRAND)(26,28).

3) Bestimmung des neugebildeten Cholesterins

Es werden 4 ml des Petrolätherauszuges bis zur Trocknung eingedampft und der Rückstand wieder in 4 ml Bloor'scher Lösung (3 Teile Alkohol, 1 Teil Äther) gelöst. Diese Lösung wird gegen Phenolphthalein mit 2 n KOH ausreichend alkalisiert und 1 Std. lang bei 37° im Wasserbad verseift.

Zur Vermeidung einer Selbstabsorption wurde im Gegensatz zu HINKELMANN e.a. und um die Plättchenbeschickung möglichst dünn zu halten, kein inaktives Cholesterin dazugegeben (25).

Zur Reindarstellung des Cholesterins wird nun eine Digitoninfällung vorgenommen mit einer 1 % Digitoninlösung in 50 % Alkohol. Es entsteht ein unlösliches Cholesterindigitonid. Nach Stehen über Nacht wird der entstandene Niederschlag^{*}) auf Filterplättchen^{**}) filtriert und um alle Reste von Fett und anderen unspezifischen Substanzen zu entfernen, mit einer Aceton-Aethermischung (1:1) nachgewaschen.

4) Messung der Aktivität

Die Messung erfolgte nach absoluter Trocknung der Plättchen in einem Methandurchflussszähler^{***}) bei gleicher Spannung und

^{*}) Filtriervorrichtung für radioaktive Niederschläge der Firma Schott & Gen., Mainz.

^{**}) Papierfilterplättchen "Selecta" der Firma Schleicher u. Schull, Nr. 566, Durchmesser 2,8 cm.

^{***}) Methandurchflussszähler FH 51 der Fa. Frieske u. Hoepfner, Erlangen Bruck, 2 Zählrohr FH 512, Spannung 3450 V, Diskriminatorstellung 10.

konstantem geometrischen Abstand. Zum Vergleich der einzelnen Ergebnisse untereinander diente eine Uranstandardpräparat von bekannter Aktivität. Wegen der geringen Schichtdicke - die Auswagen betragen ungefähr 2-3 mg - konnte die Korrektur durch die Selbstabsorption unberücksichtigt bleiben.

5) Bestimmung des ATP-Gehaltes

Es soll hier nur das Prinzip der ATP-Bestimmung gebracht werden, ein genaues und ausführliches Schema findet sich bei MOR - BACH (29).

ATP phosphoryliert Glukose unter dem katalytischen Einfluss von Hexokinase zu Glukose 6-Phosphat unter der Bildung von ATP. Das entstandene Glukose-6-Phosphat wird mit dem Warburg'schen Zwischenferment zu 6-Phospho-glukonsäure dehydriert. Als Wasserstoffakzeptor dient das gleichzeitig zugesetzte TPN. Durch die quantitative Bestimmung des entstehenden TPN-H kann der ATP-Gehalt berechnet werden. Die Menge des entstehenden TPN-H wird durch Zunahme der Absorption am Photometer*) verfolgt. Die Reaktion läuft, bis alles ATP aufgebraucht ist und kommt dann zum Stillstand.

Wir unterbrechen die Inkubation der in vitro-Ansätze nach 20, 40, 80 und 180 min und bestimmten jeweils das noch vorhandene ATP.

6) Bestimmung des entstehenden Cholesterins in bestimmten Zeiteinheiten

Gleichzeitig mit der ATP-Bestimmung wurde auch in den unterbrochenen Ansätzen nach der oben beschriebenen Methode das Cholesterin extrahiert und gemessen.

*) Photometer "Eppendorf" der Fa. Elektromedizinische Werkstätten Hamburg.

B. Die Fütterungsversuche

1) Darstellung des Enzymsystems

Um festzustellen, in wie weit die in-vitro erhaltenen Ergebnisse auf in-vivo Verhältnisse übertragbar sind, fütterten wir neben diesen Versuchen Tauben mit besonders markanten Fettsäuren (27). Bei den Kurzzeit-Versuchen wurde den Tauben 24 h, 12 h und 2 h vor der Dekapitation eine bestimmte Menge der Fettsäure direkt in den Kropf instilliert, bei den Langzeitversuchen wurde damit bereits 4 Tage vorher begonnen. Sie erhielten ebenfalls 2 x tgl. die gleiche Menge. Es wurde dafür gesorgt, dass die Tauben während der Versuchsdauer reichlich zu fressen und zu trinken hatten. Es wurden jeweils 2 Tauben mit der gleichen Substanz gefüttert und zu einem Ansatz verarbeitet. Nach der Dekapitation wurden die Lebern entnommen und wie oben (S.12 ff) beschrieben aufgearbeitet. Bei allen Tieren wurde gleichzeitig das Serumcholesterin bestimmt und mit einer grossen Zahl von Normaltieren verglichen.

Als Vergleichswert für den Cholesteringehalt diente ein rechnerisch ermittelter Durchschnittswert, der aus 10 Versuchsan-sätzen der in vitro-Reihe (ungefütterte Tauben) gewonnen wurde.

2) Bestimmung des Serumcholesterins

Die Bestimmung des Serumcholesterins der gefütterten Tauben erfolgte nach der Methode von ZACK. In einen 10 ml Messkolben gibt man etwa 5 ml eines Aceton-Alkoholgemisches, pipettiert 0,2 ml des zu untersuchenden Serums dazu und füllt wieder mit Aceton-Alkohol bis zur Marke auf. Ein entstehender Niederschlag wird abfiltriert. 2,5 ml des Filtrates = 0,05 ml des Serums werden in ein Reagensglas pipettiert und bis zur vollständigen

Trockne vorsichtig eingedampft. Nun werden 6 ml Eisenchlorid-Lösung dazugegeben und der Eindampfrückstand völlig gelöst. Diese Lösung wird vorsichtig mit 4 ml Schwefelsäure unterschichtet und gut umgerührt. Nach 15 min Stehen im Dunkeln (längeres Stehen im Licht zerstört die Farbe) wird gegenüber einem Leerwert am Photometer (Eppendorf) mit Filter 546 in 10 ml Cuvetten abgelesen. Der Leerwert wurde mit einer Cholesterinstandardlösung genau so weiterbehandelt, wie der Eindampf-Rückstand(30,31)

C. Verwendete Reagentien

Natriumacetat (Carb-oxyl-C¹⁴)

Horwell Radiochemical Centre, England

Palmitinsäure

Linolensäure

Erucasäure

Arachidonsäure

Linolsäure

der Firma Dr. Schuchardt, München

III. E R G E B N I S S E

Im folgenden seien die Ergebnisse unserer gesamten Versuchsreihen tabellarisch zusammengefasst. Da die Ausgangswerte, das sind die Ergebnisse der Versuchsansätze ohne Zusatz, aus uns zum Teil unbekannten - und unbeeinflussbaren - Gründen Schwankungen aufwiesen (die erhaltenen Impulszahlen in der Minute lagen zwischen 2000 und 3500) musste eine Möglichkeit gefunden werden, die einzelnen Versuche mit einander zu vergleichen. (Zum Teil beruhten diese Schwankungen sicher auf einem verschiedenen Gehalt an Fermenten, ATP, CoA u.a. in den Ausgangshomogenaten).

Uns bewährte sich nun folgendes Vorgehen: Der Ausgangswert (Supernatand fluid = im folgenden immer als "Sup" bezeichnet) wurde gleich 100 % gesetzt und alle erhaltenen Impulszahlen der Versuchsansätze mit Fettsäurezusatz in Prozenten dieses Ausgangswertes ausgedrückt. Diese Prozentzahlen sind ohne weiteres miteinander direkt vergleichbar; sämtliche im folgenden gebrachten Kurven beruhen ausschliesslich auf einer Verwertung solcher Prozentzahlen. (Bei den Zeitkurven wurde der 180 Minutenwert des Sup's und bei den ATP-Verbrauchsbestimmungen der 0 Minutenwert des Sup's und der 0 Minutenwert des Fettsäureansatzes als Ausgangswert genommen).

Tabelle I gibt die Ergebnisse der Konzentrationsreihen wieder. Hierbei ergab sich ein deutlicher Unterschied in der Wirkung auf die Höhe der Cholesterinsynthese zwischen der Palmitinsäure einerseits und den ungesättigten Fettsäuren andererseits. Während die ungesättigten Fettsäuren bei zunehmender Konzentration

eine zunehmende Hemmung zeigten, erreichte die Palmitinsäure beim Zusatz von 1 mg ihre maximale Hemmung von 49 %, um bei weiterer Steigerung bis 10 mg wieder eine abnehmende Hemmung zu ergeben. Ausserdem lag dieser Endpunkt wesentlich höher als bei den übrigen Fettsäuren. (Man muss jedoch bedenken, dass den gesättigten Fettsäuren bisher überhaupt jegliche hemmende Wirkung auf die Cholesterinsynthese abgesprochen worden war).

Die maximale Hemmung betrug im einzelnen: Palmitinsäure 49,5%, Erucasäure 29,2 %, Linolsäure 12,2 %, Linolensäure 9,6 % und Arachidonsäure 35,2 % des Ausgangswertes. In Kurve 1 sind diese Zahlen noch einmal zusammengefasst.

Tabelle II gibt Aufschluss über die zeitliche Verteilung der Cholesterin-Neuentstehung bei Normalansätzen und bei Versuchsansätzen, die unter Zusatz der einzelnen Fettsäuren inkubiert wurden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass bereits in den ersten 20 Minuten ein grosser Teil des Cholesterins gebildet ist (nämlich 30 - 50 %) und der Rest in den folgenden 160 Minuten etwa gleichmässig gebildet wird. Die Synthese ist nach 180 Minuten fast vollständig zum Abschluss gekommen. Daneben war aber doch bemerkenswert, dass die Hemmung der Cholesterinsynthese durch Fettsäuren keineswegs bereits am Anfang einsetzt, sondern, dass sowohl die Ansätze mit, wie auch ohne Fettsäurezusatz etwa die gleiche Cholesterinneubildung zeigen bis zu dem Punkt, an den in den Ansätzen mit Fettsäurezusatz die maximale Cholesterinsynthese erreicht ist. Hier hört die Synthese fast vollständig auf (bei etwa 80 Minuten). Es ist also nicht, wie vermutet werden konnte, von Anfang an eine dem endgültigen Verhältnis ent-

sprechende prozentuale Hemmung vorhanden. Die Werte lagen sogar zum Teil deutlich über den durchschnittlichen Sup-Werten (z.B. Arachidonsäure). Kurve 2 zeigt dies zusammenfassend.

Tabelle III gibt die Veränderungen des ATP-Gehaltes im Verlaufe der Inkubation wieder. Die Bestimmung des ATP's ermöglichte es, in die enzymatischen Bedingungen und Vorgänge unseres Enzymsystems einen Einblick zu erhalten.

Die Werte sind in Gamma-ATP pro 3 ml Ansatz angegeben und in Prozent des ATP-Gehaltes des noch nicht inkubierten Versuchsansatzes umgerechnet. Die Kurven 4 und 5 zeigen deutlich die Parallelität von ATP-Abnahme und Cholesterinsynthese (in Kurve 4: flacher Anstieg des Cholesterins, Maximum bei 80 min, langsame Abnahme des ATP, Minimum bei 80 min; Kurve 5: steiler Anstieg des Cholesterins, Maximum bei 40 min, rascher Abfall des ATP, Minimum bei 40 min). Zum Vergleich wurde in beide Kurven noch der durchschnittliche ATP-Verbrauch und die durchschnittliche Cholesterinsynthese aus 4 Sup-Ansätzen eingetragen.

Die Fütterungsversuche sollten nur am Rande eine Bestätigung der in vitro gefundenen Ergebnisse bringen. Wir fütterten bei jedem Versuch 2 Tauben, um individuelle Schwankungen möglichst vermeiden zu können und bereiteten aus den Lebern Homogenate, die ebenfalls nach der oben angegebenen Technik aufgearbeitet wurden.

Tabelle V zeigt hierbei (Tabelle IV gibt nur einen Überblick über 10 Versuchsergebnisse bei nicht gefütterten Tauben), dass bei einer optimalen Konzentration (Palmitinsäure 300 mg, Eruca-

säure 30 mg 1 1/2 Tage) die Cholesterin-Synthesefähigkeit auf ungefähr 5 % gesenkt werden kann, und zwar innerhalb kürzester Zeit, dass aber bei Gaben unterhalb dieser Konzentration kein wesentlicher Effekt erreicht wird, der auch durch längere Verabreichung nicht gebessert werden kann. (Palmitinsäure 3 x 30 mg, 9 x 30 mg).

Die gleichzeitige Bestimmung des Serumcholesterins (Tabelle VI) war insofern überraschend, als es mit keiner der hier untersuchten Fettsäuren gelang, den Serumspiegel zu senken. Im Gegenteil, es war zum Teil zu recht erheblichen Anstiegen gekommen (Abb.6).

A. Die in vitro-Versuche

Tabelle I : Die Ergebnisse der Konzentrationsreihen.

Die Zahlen geben die Impulse pro min. wieder, die mit einem Versuchsansatz erhalten werden. Sie entsprechen der Cholesterinsynthese.
Sa = Summe, Mw = Mittelwert aus den gleichlaufenden Versuchen.

Die % der letzten Reihen sind auf den Sup als Ausgangswert bezogen.

1.) P a l m i t i n s ä u r e

Gesättigte Fettsäure, 16 C-Atome:

lfd.Nr.	Sup	0,1mg	0,5mg	1,0mg	5,0mg	10,0 mg
637	2571	1745	1156	1360	1885	1534
639	3796	3013	2461	2403	2282	2650
641	3589	4218	3013	1756	2396	3734
Sa.	9956	8976	6630	5519	6563	7918
Mw.	3319	2992	2210	1640	2188	2639
%	100	89,6	66,5	49,5	63,7	79,5

2.) E r u c a s ä u r e

einfach ungesättigte Fettsäure, 22 C-Atome

lfd.Nr.	Sup	0,1mg	0,5mg	1,0mg	5,0mg	10,0 mg
637	2571	1359	1639	919	744	761
639	3796	2426	1993	1593	1858	1253
641	3589	4026	3028	2239	1349	894
Sa.	9956	7811	6660	4751	3951	2908
Mw.	3319	2604	2220	1584	1317	969
%	100	78,6	67,0	47,6	39,7	29,2

3.) L i n o l s ä u r e

zweifach ungesättigte Fettsäure, 18-C-Atome

lfd.Nr.	Sup	0,1mg	0,5mg	1,0mg	5,0mg	10,0 mg
632	3942	4109	1873	1455	461	379
638	6168	4195	2888	4651	897	850
Sa.	10110	8304	4761	6106	1358	1229
Mw.	5055	4152	2381	3053	679	615
%	100	82,0	46,9	60,2	13,4	12,2

4.) L i n o l e n s ä u r e

dreifach ungesättigte Fettsäure, 18 C-Atome

lfd.Nr.	Sup	0,1mg	0,5mg	1,0mg	5,0mg	10,0 mg
630	3500	4000	3000	2000	500	375
632	3942	2807	1389	1752	764	470
640	6045	6780	6112	5063	1909	445
Sa.	13487	13587	10501	8815	3073	1290
Mw.	4462	4529	3500	2938	1024	430
%	100	101,0	78,4	65,2	23,0	9,6

5.) Arachidonsäure

vierfach ungesättigte Fettsäure, 20 C-Atome

lfd.Nr.	Sup	0,1mg	0,5mg	1,0mg	5,0mg	10,0 mg
636	3081	1866	2181	2663	2282	1185
638	6168	5607	2853	3251	1473	2273
640	6045	1993	1541	2626	2722	1912
Sa.	15294	9466	6575	8504	6476	5370
Mw.	5098	3155	2192	2835	2159	1790
%	100	61,8	43,0	55,1	42,4	35,2

Abbildung 4

Die Kurven geben die prozentuale Hemmung wieder, die sich mit Palmitinsäure, Erucasäure, Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure erzielen lassen.

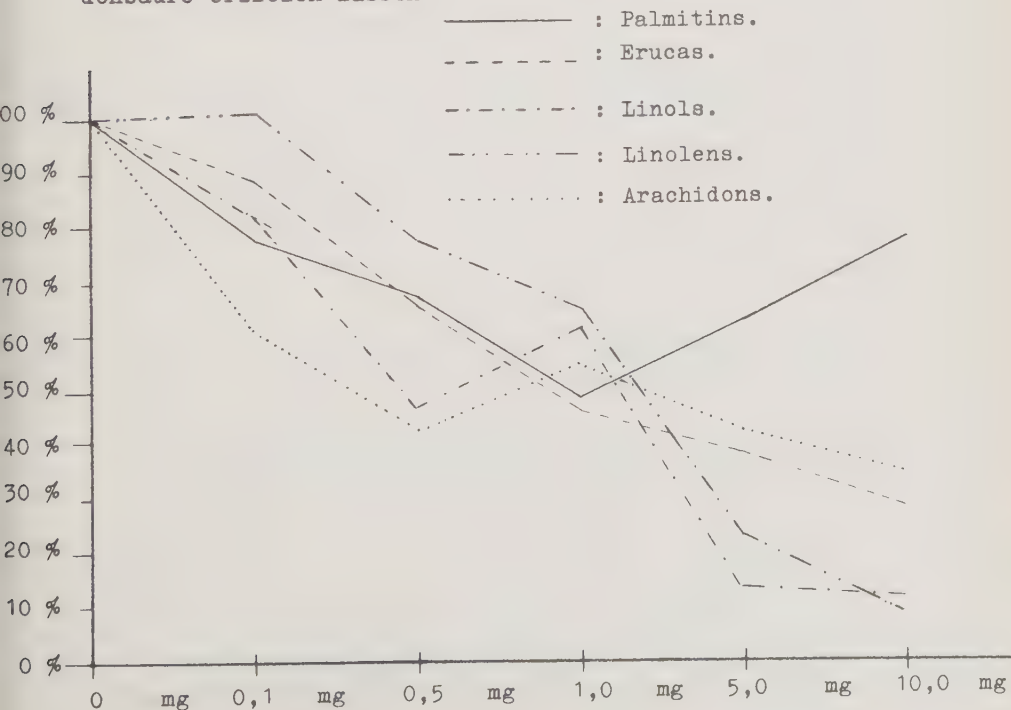


Tabelle II: Zeitkurven

Die Zahlen geben die Impulse pro min. wieder, die sich aus einem Versuchsansatz nach 20, 40, 80, 180 min erzielen liessen.

Nr. 4 wurde durch Verwertung aller Sup-Ergebnisse dieser Versuchsreihe gewonnen und diente als durchschnittliche Vergleichsbasis für Abbildung 5.

1.) P a l m i t i n s ä u r e

lfd.Nr.	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg
	- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
609	418	1337	1463	415	958	1749	2975	1349
614	2152	2152	1857	3687	4781	6160	12717	4148
Sa.	2570	3489	3320	4102	5739	5709	15692	5597
Mw.	1245	1745	1660	2051	2869	2855	7846	2799
%	15,9	22,4	21,5	26,5	37,2	36,8	100	36,0

2.) L i n o l s ä u r e

lfd.Nr.	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg
	- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
614	2152	1609	1857	4850	4781	4046	12717	6451
%	16,8	12,7	14,2	38,0	37,4	32,0	100	51,5

3.) A r a c h i d o n s ä u r e

lfd.Nr.	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg
	- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
587	2131	1989	3030	3222	2190	2260	3835	1904
%	55,5	50,0	80,1	84,6	55,2	60,7	100	50,2

4.) Supernatand fluid

lfd.Nr.	Sup - 20 min -	Sup - 40 min -	Sup - 80 min -	Sup - 180 min -
587	2131	3030	2190	3835
597	530	508	612	658
609	418	1463	958	2975
614	2152	1857	4781	12717
Sa.	5231	6858	8549	20185
Mw.	1308	1714	2137	5046
%	26,0	34,0	41,8	100

Abbildung 5

Die Cholesterinsynthese bei verschiedener Inkubationsdauer
(20, 40, 80, 180 min.).

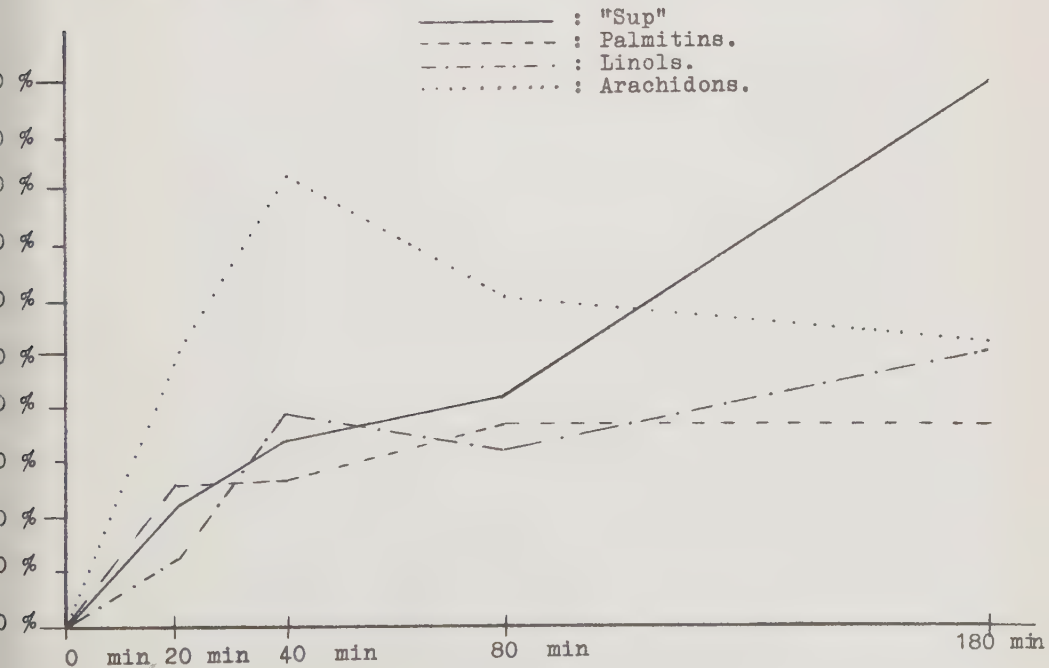


Tabelle III: Veränderungen des ATP-Gehaltes nach 20, 40, 80, 180 min. Inkubationsdauer.

Die Zahlen entsprechen γ -ATP pro 3 ml Ansatz.

1.) P a l m i t i n s ä u r e

lfd.Nr.	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg
	- 0 min -		- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
609	142,7	165,5	113,7	77,7	177,5	81,3	22,1	47,5	22,2	31,1
614	314,2	316,0	107,7	97,8	143,7	127,7	22,1	22,6	6,5	84,4
Sa.	456,9	481,5	221,4	175,5	321,2	219,0	44,2	70,1	29,7	115,5
Mw.	228,5	240,8	110,7	87,8	160,6	109,5	22,1	35,1	14,9	57,7
%	100	100	51,5	36,4	73,2	45,5	9,3	14,5	6,5	24,4

2.) E r u c a s ä u r e

lfd.Nr.	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg	Sup	1 mg
	- 0 min -		- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
587	194,6	186,5	27,7	102,6	9,3	9,3	3,1	18,7	15,4	12,5
597	107,7	122,9	15,2	70,8	58,8	31,1	61,8	74,9	9,5	53,1
Sa.	262,3	309,4	42,9	173,4	68,1	40,4	64,9	93,6	24,9	65,1
Mw.	131,2	154,7	21,5	86,7	34,1	20,2	32,5	46,8	12,5	32,1
%	100	100	16,3	56,0	26,2	13,2	24,8	30,2	9,6	21,1

3.) L i n o l s ä u r e

lfd.Nr.	Sup 1 mg		Sup 1 mg		Sup 1 mg		Sup 1mg		Sup 1 mg	
	- 0 min -		- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
614	314,2	316,0	107,7	97,8	143,7	127,7	22,1	22,6	6,5	84,1
%	100	100	34,2	30,6	45,6	39,8	7,1	7,3	2,6	9,1

4.) A r a c h i d o n s ä u r e

lfd.Nr.	Sup 1 mg		Sup 1 mg		Sup 1 mg		Sup 1 mg		Sup 1 mg	
	- 0 min -		- 20 min -		- 40 min -		- 80 min -		- 180 min -	
587	154,6	243,1	27,7	27,9	9,3	12,2	3,1	12,1	15,4	18,
%	100	100	18,1	12,0	6,1	5,1	2,0	5,1	10,0	7,

5.) S u p e r n a t a n d f l u i d

lfd.Nr.	Sup	Sup	Sup	Sup	Sup
	- 0 min -	- 20 min -	- 40 min -	- 80 min -	- 180 mi
587	154,6	27,7	9,3	3,1	15,4
597	107,7	15,2	58,8	61,8	9,5
609	142,7	113,7	177,5	22,1	22,2
614	314,2	107,7	143,7	22,1	6,5
Sa.	719,2	262,3	389,3	109,1	53,6
Mw.	179,8	65,6	97,3	27,3	13,4
%	100	36,4	54,1	15,2	7,5

Abbildung 6

Die Veränderung des ATP-Gehaltes bei Ansatz ohne Zusatz und bei Ansätzen mit Zusatz von je 1 mg Palmitinsäure, Erucasäure, Linolsäure und Arachidonsäure nach 20, 40, 80 und 180 min. Inkubationsdauer.

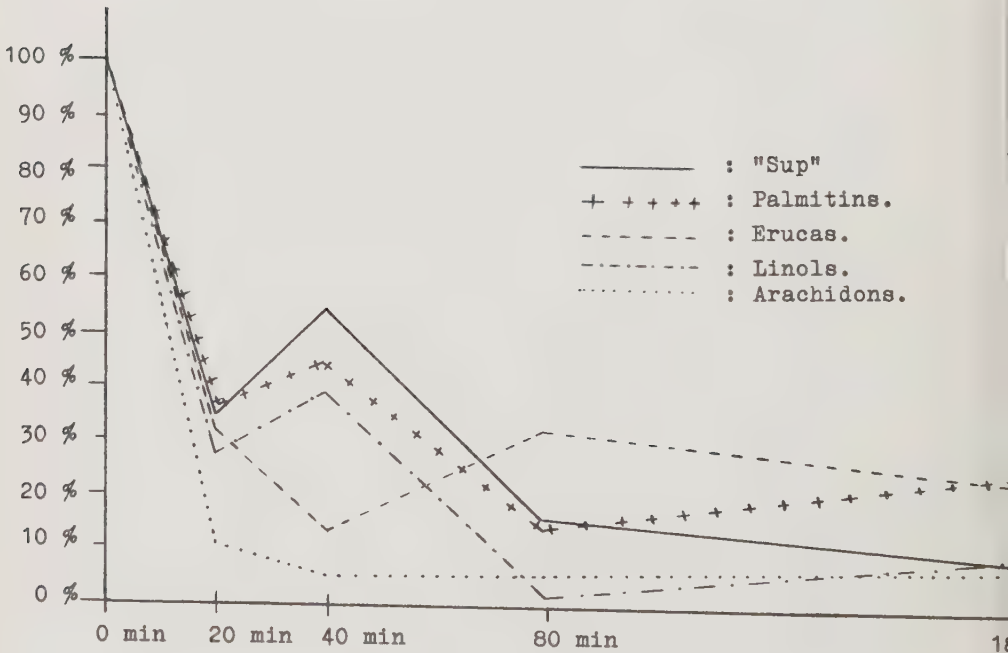


Abbildung 7

ATP-Gehalt und Cholesterinentstehung unter Zusatz von Palmitinsäure.

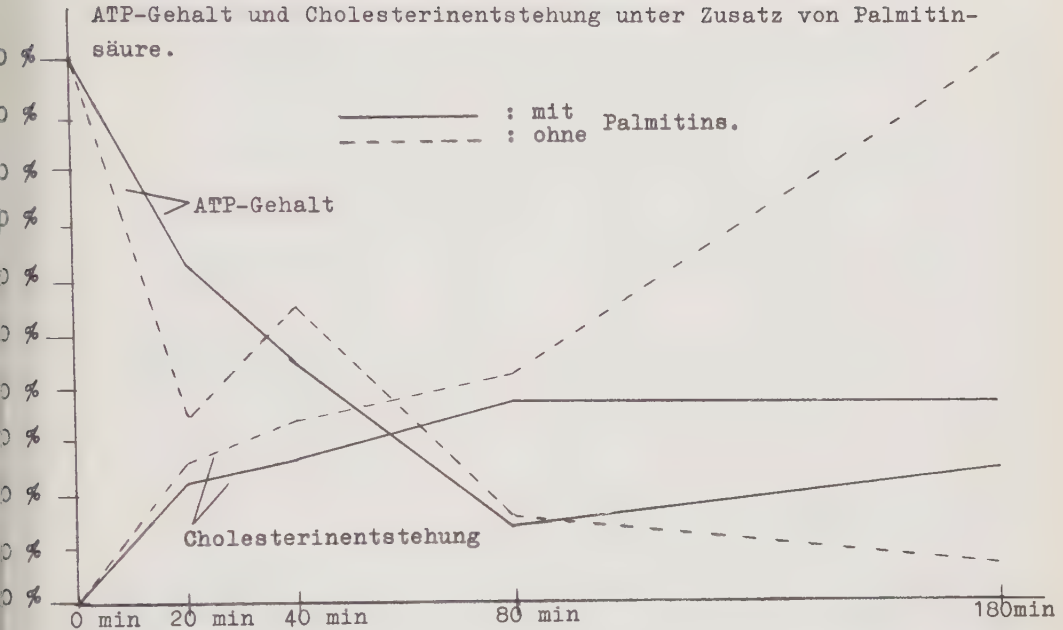
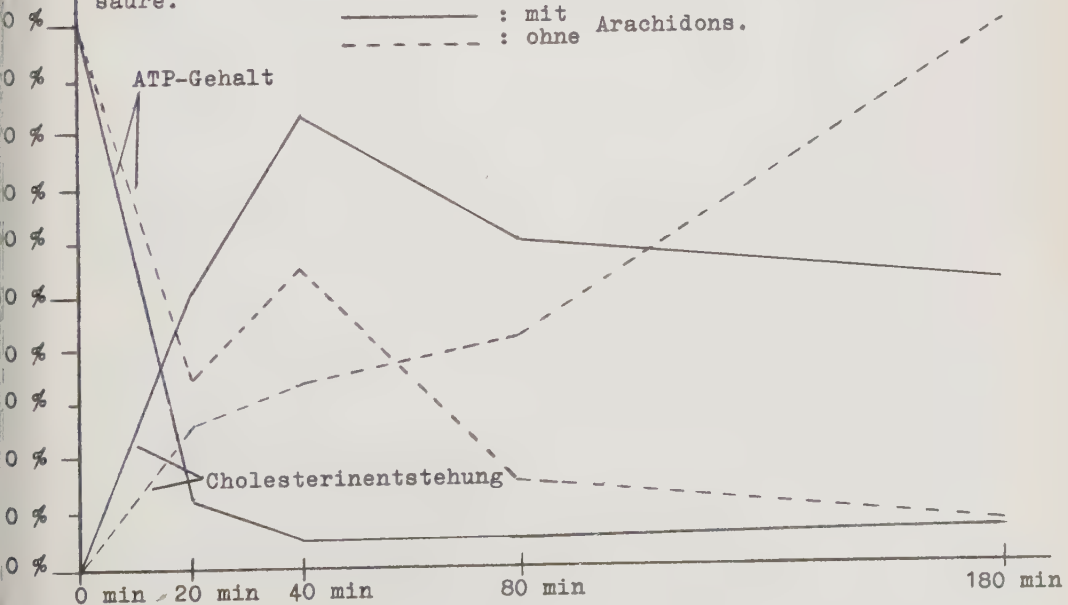


Abbildung 8

ATP-Gehalt und Cholesterinentstehung unter Zusatz von Arachidonsäure.



B. Die Fütterungsversuche

Tabelle IV: Durchschnittlicher Sup-Wert aus 10 Versuchen der in-vitro Reihe (s.o.) mit den Homogenaten aus nicht gefütterten Tauben.

<u>lfd.Nr.</u>	<u>Imp./min</u>	<u>lfd.Nr.</u>	<u>Imp./min</u>	
587	2131	614	2152	
630	3500	632	3942	insgesamt:
636	3081	637	2571	37417 Imp./min : 10 =
638	6168	639	3796	3742 Imp./min im
640	<u>6045</u>	641	<u>3589</u>	=====
				Durchschnitt im Ansatz

Tabelle V: Fütterungsversuche

<u>lfd.Nr.</u>	<u>gefütterte Substanz</u>	<u>gefütterte Menge</u>	<u>Fütterungs- dauer</u>	<u>Imp./min</u>	<u>% Hemmung</u>
611	Palmitinsäure	30 mg	12 stündl. 3x	2082	56,2 %
621	Palmitinsäure	30 mg	12 stündl. 9x	2811	76,4 %
615	Palmitinsäure	300 mg	12 stündl. 3x	212	5,7 %
610	Erucasäure	30 mg	12 stündl. 3x	701	19,1 %
601	Erucasäure	30 mg	12 stündl. 3 x	264	7,1 %
621	Erucasäure	30 mg	12 stündl. 9x	1129	30,4 %
615	Linolsäure	30 mg	12 stündl. 3x	1180	31,6 %

Die %tuale Hemmung ist auf den durchschnittlichen Wert, der in Tabelle IV angegeben ist, bezogen.

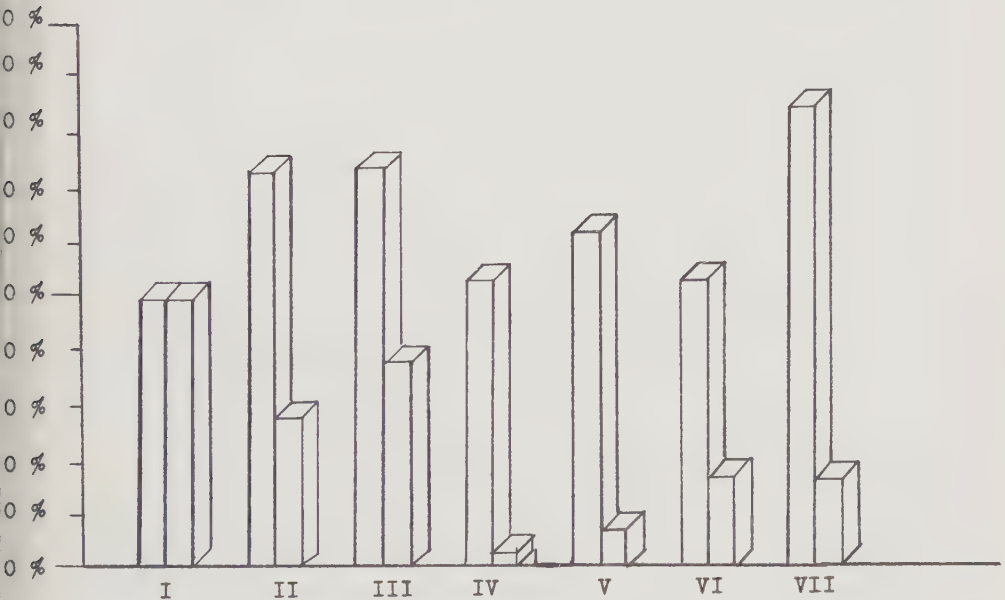
Tabelle VI: Serumcholesterin

Die Zahlen entsprechen mg% Cholesterin, gewonnen aus dem Serum der in Tabelle V beschriebenen Tauben.

Normal	Palmitinsäure			Erucas.		Linols.
	3x30 mg	9x30 mg	3x300mg	3x30 mg	9x30 mg	3x30 mg
315	457	459	331	390	333	532
mg%=100%	mg%=146%	mg%=148%	mg%=105%	mg%=124%	mg%=106%	mg%=170%

Abbildung 9

Cholesterinsynthesehemmung in der Leber und Serumcholesterin in %.



Linke Säule: Serumcholesterin

Rechte Säule: Lebercholesterinsynthese

I : Normalwerte

II : 3x30 mg Palmitinsäure

III: 9x30 mg Palmitinsäure

IV : 3x300 mg Palmitinsäure

V: 3x30 mg Erucasäure

VI : 9x30 mg Erucasäure

VII: 3x30 mg Linolsäure

IV. D I S K U S S I O N

Wie wir im Vorhergehenden gesehen haben, lassen sich mit allen untersuchten Fettsäuren (gesättigte; 1-fach, 2-fach, 3-fach und 4-fach ungesättigte) Hemmungen der Cholesterinsynthese, zum Teil extremen Ausmasses, erzielen. An welcher Stelle greifen nun die Fettsäuren in die Cholesterinneusynthese ein?

WOOD und MIGICOVSKY (34,35) fanden bei gleichzeitiger Untersuchung des Einflusses von Fettsäuren auf die Cholesterin- und Fettsäuresynthese folgendes: Bei der Verwendung von geradzahli- gen Fettsäuren als Inhibitoren kommt es zu einem Anstieg der radioaktiv markierten Fettsäuren und zu einem Abfall der mar- kierten Cholesterinmenge, bei der Verwendung ungeradzahli- ger Fettsäuren kommt es dagegen zu einem Abfall beider Gruppen. Allerdings entsprach der prozentuale Anstieg der Fettsäuren nicht dem prozentualen Abfall des Cholesterins. Letzteres überwog sehr stark. Durch chromatographische Untersuchungen konnten siefest- stellen, dass es sich gar nicht um die Neubildung von Fettsäu- ren handelte, sondern dass es zu einer Anlagerung von Acetyl- CoA an die dazugegebenen Fettsäuren gekommen war. Es konnten nämlich ausschliesslich Fettsäuren aufgefunden werden, die eine um 2 C-Atome längere Kette hatten als die zugesetzten. Diese Anlagerung findet allerdings nur bei geradzahli- gen Säuren statt, nicht dagegen bei ungeradzahli- gen. Die gleichzeitige Abnahme der Cholesterinrate könnte also durch einen Mangel an Acetat be- dingt sein, das ja für die Verlängerung der Ketten gebraucht wird. Jedoch konnte durch ein Mehrangebot von C¹⁴-Acetat die

Cholesterinhemmung nicht verändert werden. Ausserdem sprach ja auch das Verhältnis von Zu- und Abnahme gegen eine solche Theorie.

Auch ein Mangel an CoA, das für die obige Reaktion gebracht wird, konnte nicht die Ursache sein, denn ein Zusatz von CoA ergab ebenfalls keine Besserung. WOOD und MIGICOVSKY (34,35) schlossen nun aus der Tatsache, dass Cholesterin und Fettsäuresynthese bei ungeradzahligen Fettsäuren in gleichem Masse gehemmt sind, dass die Hemmung zu einem Zeitpunkt einsetzen muss, zu dem der Entstehungsweg beider Produkte noch gemeinsam verläuft. Seit den Untersuchungen von LANGDON und BLOCH (5,6,7) weiss man, dass das Acet-Acetyl-CoA ein Vorläufer sowohl der Cholesterinsynthese, wie auch der Fettsynthese ist. Ein Eingreifen an dieser Stelle muss also beide Gruppen treffen. AVIGAN e.a. (36) konnte in der Tat zeigen, dass die Bildung von Acetoacetat durch Fettsäuren unterbunden wird, die Bildung des Acetyl-CoA jedoch durch eben diese Säuren nicht beeinflusst wird.

Auch in unserem Laboratorium gingen Bestimmungen der Fettsäuresynthese neben den Cholesterinbestimmungen einher. Wir fanden im Gegensatz zu WOOD und MIGICOVSKY auch bei Zugabe von geradzahligen Fettsäuren eine deutliche Hemmung beider Gruppen. Es kam also nicht zu einer nennenswerten Umlagerung zu längeren Ketten. Die Hemmung geht in beiden Gruppen etwa parallel und erreicht auch etwa den gleichen prozentualen Grad der Hemmung. Nur kurz soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass auch wir ATP und CoA zu den Versuchsansätzen zugegeben hatten mit

unterschiedlichen Ergebnissen. In einem Teil der Versuche konnte keinerlei Effekt erzielt werden, in einem anderen Teil kam es zu einer deutlichen Förderung. Da die Ergebnisse keine genaue Aussage erlauben, sollen keine Zahlenwerte angegeben werden. Da die Sup-Ansätze ebenfalls teils gefördert werden, teils unbeeinflusst blieben, schlossen wir hieraus, dass die Enzymsysteme aus einem gewissen anfänglichen Co-fermentmangel heraus nicht in der Lage waren, das angebotene Acetat voll zu verwerten. Erst durch die Zugabe der fehlenden Co-fermente konnte die Synthese voll in Gang gebracht werden.

Wie hat man sich aber nun den Block der Synthese an der Stelle des Aufbaues von Acetoacetat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA vorzustellen? WOOD und MIGICOVSKY (34) vermuten die Bildung eines Komplexes mit einem Teil des Enzymsystems, das bei diesem Schritt benötigt wird, eines Komplexes, der wohl die Verlängerung einer vorhandenen Fettsäure ermöglicht, nicht dagegen den Neuaufbau einer solchen. Näheres ist allerdings nicht bekannt.

Die Ergebnisse unserer Fütterungsversuche stehen in einem gewissen Gegensatz zu den bisherigen klinischen Erfahrungen. Das Homogenat, das wir aus Lebern solcher Tauben gewannen, die mit Fettsäure gefüttert waren, hatte dieselbe geringe Cholesterinsynthesefähigkeit, wie wenn wir den in vitro Ansätzen eine relativ hohe Dosis Fettsäure hinzugesetzt hätten. Die Ergebnisse lagen, wie oben angegeben zwischen 5-30 % eines durchschnittlichen Ausgangswertes, wobei die Dauer der Fütterung

auf das Ergebnis keinen entscheidenden Einfluss hatte.

Klinische Untersuchungen waren nun zu dem Ergebnis gekommen, dass eine Senkung des Cholesteringehaltes des Serums nur mit den ungesättigten Fettsäuren möglich ist, nicht dagegen mit gesättigten; ja, dass es bei der Gabe von gesättigten Fettsäuren sogar zu einem Anstieg der Serumcholesterinwerte kommen kann.

Unsere eigenen in vivo-Untersuchungen lassen keinen Schluss auf einen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu. (Auf der einen Seite die gesättigten, auf der anderen die ungesättigten Fettsäuren). Wir konnten mit beiden Gruppen etwa die gleichen Hemmungen erzielen mit dem einzigen Unterschied, dass wir bei den gesättigten Säuren (Palmitinsäure) etwa die 10 fache Menge benötigten um den gleichen Effekt zu erreichen. Diese gefütterten 300 mg sind eine bedeutende Menge bei einem Taubengewicht von etwa 300 g. Eine Berechnung zeigt, mit welcher hohen Dosen gesättigter Fettsäuren man arbeiten muss, um auch beim Menschen einen Effekt zu erzielen (2 x tgl. 300 mg für die Taube heisst beim Menschen etwa 140 g Fettsäuren tgl., das entspricht etwa 1200 kal.). Man müsste also etwas mehr als die Hälfte der benötigten Kalorien als Fett geben, um einen cholesterinsenkenenden Effekt zu erzielen, sich aber dabei strikt vor einer überkolorischen Ernährung hüten; dann allein diese vermag schon den Cholesterinspiegel zu heben. Diese Menge dürfte wohl in keiner Diät berücksichtigt worden sein, so dass die bisherigen Misserfolge zwanglos durch eine deutliche Unterdosierung zu erklären sind. Bei den ungesättigten Fettsäuren

konnte eine solche Unterdosierung nicht vorkommen, da - wie gesagt - ein Zehntel der Konzentration genügt, einen deutlichen Effekt hervorzurufen.

Wir konnten also keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen von Fettsäuren finden, der die Bevorzugung der einen und die Ablehnung der anderen rechtfertigen würde.

Überraschend und unerwartet waren bei unseren Versuchen die Ergebnisse des Serumcholesterins. Auch bei Tauben, deren Lebern in Bezug auf die Cholesterinsynthesefähigkeit extrem gehemmt waren, konnte kein erniedrigter Serumcholesterinspiegel festgestellt werden. Die Ursache war vielleicht die verhältnismässig kurze Versuchsdauer von 4 Tagen. Man konnte allerdings erwarten, dass auch bereits nach 4 Tagen ein Effekt zu sehen war, denn es ist bekannt, dass das Taubencholesterin eine wesentlich kürzere Halbwertszeit hat als das menschliche Cholesterin, d.h. die Zeit, in der die Hälfte des vorhandenen Cholesterins abgebaut ist und durch neugebildetes oder durch die Nahrung aufgenommenes Cholesterin ersetzt ist, beträgt etwa 2-4 Tage. Vielleicht lag es aber auch an der Ernährung mit Weizenkörnern, durch die den Tauben zu viel exogenes Cholesterin zugeführt worden war. Vielleicht führte aber auch die Hemmung in der Leber zu einer Mobilisation sämtlicher Reserven des Körpers (Leber, Gewebe) die den Serumspiegel noch über lange Zeit im Bereiche der Norm halten können. Es ist bekannt, dass auch bei Hunger der Serumcholesterinspiegel erst nach relativ langer Zeit zu sinken beginnt.

Es gelingt sowohl mit gesättigten (Palmitins.) als auch ungesättigten (Erucas., Linols., Linolens., Arachidons.) Fettsäuren in den Aufbau des Cholesterins hemmend einzugreifen, aller Wahrscheinlichkeit nach an der Stelle der Bildung des Acetoacetates. Die Art der Hemmung ist noch unbekannt. Diese Ergebnisse konnten auch an Hand von Fütterungsversuchen bestätigt werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der senkende Effekt der Fettsäuren: Palmitinsäure, Erucasäure, Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure auf die Cholesterinsynthese in-vitro untersucht.

Ausgangsmaterial waren Enzymsysteme aus Taubenlebern, die im Stande sind, aus C^{14} -Acetat Cholesterin zu bilden. Es zeigte sich, dass es sowohl mit der gesättigten, wie auch mit den ungesättigten Fettsäuren gelingt, die Cholesterinsynthese zu hemmen. Während die ungesättigten Fettsäuren bei zunehmender Konzentration eine zunehmende Hemmung zeigten, erreichte die Palmitinsäure bei Zusatz von 1 mg ihre maximale Hemmung von 49 %. Die maximalen Hemmungen betrugen im einzelnen: Palmitins.: 49 %, Erucas.: 29%, Linols.: 12 %, Linolens.: 9 %, Arachidons.: 35 % eines Ausgangswertes.

Bei einer Untersuchung der zeitlichen Verteilung der Cholesterinentstehung nach 20, 40, 80 und 180 Minuten zeigte sich, dass in den Ansätzen mit Zusatz etwa die gleiche Synthese erfolgte, wie in den Leeransätzen, bis das endgültige Maximum erreicht ist. Hier kommt die Synthese fast vollständig zum Stillstand (nach etwa 80 min). Eine gleichzeitige Untersuchung des ATP-Gehaltes ergab eine deutliche Parallelität zwischen ATP-Abnahme und Cholesterin-Entstehung.

Neben diesen Untersuchungen wurden Fütterungsversuche unternommen. Die Tauben wurden verschiedene Zeiten mit den Substan-

zen gefüttert, die Lebern wie bei den in vitro Ansätzen aufgearbeitet und die Cholesterinsynthesefähigkeit durch Zusatz von C^{14} -Acetat untersucht. Es konnte bei einer optimalen Konzentration ein fast vollständiges Erliegen der Synthese erreicht werden. Diese Konzentration ist allerdings bei der gesättigten Fettsäure etwa 10 mal so hoch wie bei den ungesättigten. Bei dem gleichzeitig untersuchten Serumcholesterin konnte aus unbekannten Gründen kein senkender Einfluss der untersuchten Fettsäuren festgestellt werden.

Es wird vermutet, dass der Punkt, an dem die Fettsäuren in den Cholesterinentstehungsmechanismus eingreifen bei der Bildung des Aceto-Acetates aus dem Acetyl-CoA liegt, denn die bestimmte Fettsäureneubildung war ebenfalls gehemmt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Universitäts-Poliklinik München durchgeführt.

Für die Möglichkeit in diesem Labor arbeiten zu dürfen und für die Überlassung des Themas bin ich Herrn Prof. Dr. W. Seitz zu besonderem Dank verpflichtet.

Ganz besonders möchte ich jedoch der Leiterin des Isotopenlabors, Freifrau Dr.Dr. Vera von Brand danken, die mir unermüdlich bei der Durchführung der Experimente ratend zur Seite stand und mir die Grundlagen einer biochemischen Arbeits- und Denkweise vermittelte.

Gleichzeitig möchte ich auch den Technischen Assistentinnen B. v. Kutzschenbach, I. Thöring und H. Wilde für ihre freundliche und hilfsbereite Unterstützung danken.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1.) Leuthardt, F.:
Lehrbuch der physiologischen Chemie, Berlin 14.A.,
S. 41 ff, 368 ff.
- 2.) Ruzika, L.:
The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds
Experientia 9/357, 53
- 3.) Henning, U.:
Die Biosynthese des Cholesterins .
Dtsch.Med.Wschr. 84, 760, 59
- 4.) Rittenberg, D., Schoenheimer, R.:
J. biol. Chem. 121, 235, 37
- 5.) Langdon, R.G., Bloch, K.:
The biosynthesis of Squalene. - J.biol.Chem. 200, 129, 53
- 6.) Langdon, R.G., Bloch, K.:
The effect of some dietary additions on the synthesis of
Cholesterol from Acetat in vitro.
J. biol. Chem. 202, 77, 53
- 7.) Langdon, R.G., Bloch, K.:
The utilization of Squalene in the biosynthesis of Chole-
sterol. - J. biol. Chem. 200, 135, 53
- 8.) Olsen, J.A., Lindberg, M., Bloch, K.:
On the demethylation of Lanosterol to Cholesterol.
J. biol. Chem. 226, 941, 57
- 9.) Dituri, F., Rabinowitz, J.L., Hullin, R.P., Gurin, S.:
Precursors of Squalene and Cholesterol.
J. biol. Chem. 229, 825, 57

- 10.) Tomkins, G.M., Dauben, W.G., Sheppard, H., Chaikoff, I.L.:
Squalene as a precursor of Cholesterol in liver.
J. biol. Chem. 202, 487, 53
- 11.) Clayton, R., Bloch, K.:
The biological conversion of Lanosterol to Cholesterol.
J. biol. Chem. 218, 319, 56
- 12.) Tchen, T.T., Bloch, K.:
On the conversion of Squalene to Cholesterol in vitro.
J. biol. Chem. 226, 921, 57
- 13.) Lynen, F., Henning, U.:
Biochem. Z. 330, 269, 58
- 14.) Rabinowitz, J.L., Gurin, S.:
Biosynthesis of Cholesterol and beta-hydroxy-beta-methyl-
glutaric acid by extracts of liver.
J. biol. Chem. 208, 307, 54
- 15.) Lynen, F., Henning, U.:
Zusammenfassung des IV, internat.Kongresses f. Biochem. 47
(Wien 1958)
- 16.) Lang, K.:
Der intermediäre Stoffwechsel. (Berlin 52)
- 17.) Heilmeyer, L.:
Lehrbuch der Inneren Medizin. (Berlin 55)
- 18.) Sturm, A.:
in Heilmeyer: Lehrbuch der pathol.Physiol.
Stuttgart 55 , S. 488 ff.

- 19.) Schrade, W.:
Über die Poly - en säuren des Blutes in "Arteriosklerose
und Ernährung" - 2. Symposium in Bad Neuenahr
(Darmstadt 59, s.115)
- 20.) Schön, H., Henning, U.:
Untersuchungen zur Regulation des Cholesterinstoffwechsels.
Dtsch.Med.Wschr. 31, 1385, 59
- 21.) Fischer, F.W.:
Arteriosklerose und Ernährung, 2. Symposium Bad Neuenahr
(Darmstadt 59, S.127)
- 22.) Bucher, N.L.R., Frantz jr., J.D.:
The incorporation of the carboxyl-carbon from Acetat into
Cholesterol by rat liver homogenates.
J. biol. Chem. 206, 471, 54
- 23.) Bucher, N.L.R., Mc Garrahan, K.:
The biosynthesis of Cholesterol from Acetat-1-C¹⁴ by cellu-
lar fractions of rat liver.
J. biol. Chem. 222, 1, 56
- 24.) Brady, R.O., Gurin, S.:
Biosynthesis of fatty acids by cellfree or watersoluble
enzyme systems.
J. biol. Chem. 199, 421, 52
- 25.) Frantz, jr. J.D., Schneider, H.S., Hinkelmann, B.:
Supression of Cholesterolsynthesis in the rat by chole-
sterol-feeding.
J. biol . Chem. 206, 465, 54
- 26.) v.Brand, V., Helmreich, E.:
Biochem. Z. 328, 146, 56

27.) v. Brand, V.:

Ein Beitrag zur Fettsynthese.

Biochem.Z. 331, 162, 59

28.) v. Brand, V.:

Unveröffentlichte Versuche.

29.) Morbach, H.J.:

Die Veränderungen des ATP-Gehaltes.

Inauguraldissertation München 59

30.) Zack, B., Dickenham, R.C., White, E.G., Burnett, H., Cherney, P.J.

Am. J. Clin. Patholog. 24, 1307, 54a

31.) Zack, B., Moss, N., Boyle, A.J., Zlatkis, A.:

Anal. Chem. 26, 776, 54b

32.) Calvin, M., Heidelberger, C., Tolbert, B.M., Yankwich, P.E.:

Isotopic Carbon (New York 49)

33.) Kritchevsky, D.:

Cholesterol (New York 58)

34.) Wood, J.D., Migicovsky, B.B.:

A possible mechanism for fatty-acid inhibition of
Cholesterol synthesis.

Can.J.Biochem. Physiol. 35, 645, 57

35.) Wood, J.D., Migicovsky, B.B.:

Can. J.Biochem. Physiol. 34, 861, 56

36.) Avigan, J., Quastel, J.H., Scholefield, P.G.:

Biochem. J. 60, 329, 55

L e b e n s l a u f

=====

Ich, Christof Sund, wurde am 27. August 1935 als erstes Kind des Verlagsbuchhändlers Dr. Georg Sund und seiner Ehefrau Berta, geb. Branz, in München geboren. Nach Besuch der Volksschulen in München und Orsenhausen, Landkreis Biberach, trat ich im Herbst 1945 in das humanistische Maximiliansgymnasium in München ein, an dem ich mich nach 8 Jahren, im Sommer 1953, der Reifeprüfung unterzog. Ich begann danach sofort das Studium der Medizin an der Universität München. Hier legte ich auch nach 5 Semestern im Frühjahr 1956 die ärztliche Vorprüfung mit der Note II ab. Nach dem ersten klinischen Semester studierte ich 2 Semester lang in Wien. Dann kehrte ich nach München zurück und bestand hier das Staatsexamen am 2. Juni 1959 mit der Note I = sehr gut. Das Bayerische Staatsministerium des Innern hat unter dem 18. Juni 1959 erklärt, daß ich berechtigt sei, mich als Medizinalassistent zu betätigen.

